

Produção de itens de ensaio de proficiência contendo bactérias em matriz frango utilizando a técnica de liofilização

Production of proficiency test items containing bacteria in chicken matrix using freeze-drying technique

RESUMO

Ingrid Camelo da Silva¹ 
Paula Vasconcelos Costa¹ 
Luiza Vasconcellos¹ 
Pablo Tavares Coimbra¹ 
Valéria de Mello Medeiros¹ 
Carla de Oliveira Rosas¹ 
Sílvia Maria dos Reis Lopes¹ 
Marcelo Luiz Lima Brandão^{1,*} 

Introdução: A participação em ensaios de proficiência (EP) é utilizada para avaliar a competência de laboratórios de ensaio e calibração. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade da técnica de liofilização na produção de seis lotes de itens de EP, dois contendo *Escherichia coli*, dois contendo *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* concomitantemente, e dois contendo *Salmonella* Enteritidis em matriz frango desfiado cozido. **Método:** Foram realizados testes de homogeneidade segundo o protocolo harmonizado e de estabilidade em longo prazo pelo modelo clássico e curto prazo pelo modelo isócrono segundo a ISO Guide 35. **Resultados:** Todos os lotes produzidos foram considerados suficientemente homogêneos. No estudo de estabilidade em longo prazo, todos os lotes se apresentaram suficientemente estáveis nas temperaturas de $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e $-20 \pm 4^\circ\text{C}$, exceto o lote contendo *B. cereus* e *S. aureus*. Os outros lotes apresentaram estabilidade por pelo menos 126 dias a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e 84 dias a $-20 \pm 4^\circ\text{C}$. Na avaliação da estabilidade em curto prazo, foram analisados apenas os lotes suficientemente estáveis no estudo em longo prazo. Os lotes foram suficientemente estáveis nas temperaturas de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$, com exceção do lote contendo *Salmonella* Enteritidis a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, devido ao decréscimo significativo da concentração celular. **Conclusões:** A técnica de liofilização foi satisfatória para produção de itens de ensaio contendo *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis em matriz frango viáveis para utilização em um EP, sendo que o lote contendo *Salmonella* Enteritidis deve ser transportado aos laboratórios participantes em temperatura $\leq 8^\circ\text{C}$ por até quatro dias. Lotes contendo *S. aureus* e *B. cereus*, simultaneamente, apresentaram estabilidade insuficiente, indicando que a produção de lotes individuais contendo cada bactéria individualmente é necessária.

PALAVRAS-CHAVE: Ensaio de Proficiência; Laboratórios de Ensaio; Itens de Ensaio; Controle de Qualidade; Carne de Frango

ABSTRACT

Introduction: Participation in proficiency testing (PT) is used to evaluate the competence of testing and calibration laboratories. **Objective:** To evaluate the viability of the freeze-drying technique to produce six lots of PT items containing two *Escherichia coli*, two containing *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* concomitantly, and two containing *Salmonella* Enteritidis in baked shredded chicken matrix. **Method:** Homogeneity according to harmonized protocol and long and short-term stability testing according to ISO GUIDE 35 were carried out. **Results:** All lots produced were sufficiently homogeneous. In the long-term stability study, all lots were sufficiently stable at temperatures of $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ and $-20 \pm 4^\circ\text{C}$, except for the lot containing *B. cereus* and *S. aureus*. The other lots presented stability for at least 126 days at $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ and 84 days at $-20 \pm 4^\circ\text{C}$. The short-term stability was carried out only with the lots sufficiently stable in the long-term stability study. The lots were sufficiently stable at temperatures of $5 \pm 3^\circ\text{C}$ and at $35 \pm 2^\circ\text{C}$, except for the lot containing *Salmonella* Enteritidis at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ due to the significant decrease in cell concentration. **Conclusions:** The freeze-drying technique was satisfactory for the production of test items

¹ Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Departamento de Controle de Qualidade Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: marcelo.brandao@bio.fiocruz.br



containing *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis in the chicken matrix viable to use in a PT, but the lot containing *Salmonella* Enteritidis must be transported to the laboratories at the temperature $\leq 8^{\circ}\text{C}$ for up to four days. Lots containing *S. aureus* e *B. cereus* simultaneously presented insufficient stability, indicating that the production of individual lots containing each bacteria individually is necessary.

KEYWORDS: Proficiency Test; Assay Laboratories; Test Items; Quality Control; Chicken Meat

INTRODUÇÃO

O Brasil está no 2º lugar mundial de produção de cortes de frango, com 12,9 milhões de toneladas sendo produzidas e com consumo de 41,1 kg de carne *per capita*, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA)¹. A presença de microrganismos patogênicos em carnes de frango comercializadas em diferentes países, incluindo o Brasil, já foi relatada e mostra a importância do controle rígido na cadeia produtiva deste tipo de alimento^{2,3}.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um entrave significativo ao desenvolvimento socioeconômico dos países. Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU), em 2015, o número de óbitos ao ano por DTA no mundo é de 420.000. Na América, por exemplo, são 9.000 mortes e a estimativa é de que 600 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente⁴. No Brasil, dados do Ministério da Saúde de 2009 a 2018 reportam que *Salmonella* spp. é o segundo agente etiológico mais identificado em surtos de DTA, com 11,2% dos casos, apenas ficando atrás de *Escherichia coli* (24,0%)⁵. Carne de ave *in natura*, processada e miúdos foram identificados como o alimento incriminado em 84 do total de 2.403 surtos ocorridos neste período⁵.

A confiabilidade dos resultados emitidos por laboratórios de controle de qualidade de alimentos é de suma importância para prevenir riscos à saúde do consumidor e evitar perdas econômicas⁶. Um dos sistemas de garantia da qualidade mais utilizados em laboratórios de ensaios é a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, que descreve os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Um desses requisitos é a participação periódica em ensaios de proficiência (EP). O EP desempenha um papel valioso, uma vez que fornece uma prova objetiva da competência do laboratório participante. Essa evidência pode ser utilizada para: o aprimoramento da metodologia utilizada pelo participante, o aumento da confiança nos resultados emitidos no ensaio específico e como evidência de competência para organismos de acreditação e inspeção^{8,9}. Além disso, a norma permite o reconhecimento mútuo entre países-membros do *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC), que é um fórum internacional que engloba os credenciadores de laboratórios de calibração e ensaios. O Brasil é o único país da América Latina a obter esse reconhecimento, ato que se deu em novembro 2000, o que conferiu aos relatórios de ensaios (laudos analíticos) realizados em laboratórios acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) a sua aceitação por todos os países que compõem o fórum. A acreditação facilita as práticas de comércio internacional na área de alimentos e fortalece a soberania do país¹⁰.

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 12 de janeiro de 2001¹¹, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, para pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares) à base de carnes, é preconizada a pesquisa de *Salmonella* sp/25, e contagem de coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva (ECP), *Bacillus cereus*, e clostrídios sulfito redutores a 46°C. Como a carne de frango é amplamente consumida e possui grande interesse econômico no Brasil, é necessário que os laboratórios de ensaio nacionais que realizam análises de controle microbiológico nestes produtos produzam resultados confiáveis. Dada a necessidade da qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados por estes laboratórios, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade de *E. coli*, *B. cereus* e *Staphylococcus aureus* concomitantemente, e *Salmonella* Enteritidis em matriz frango visando a produção de lotes de itens de ensaio (IE) a serem utilizados em EP.

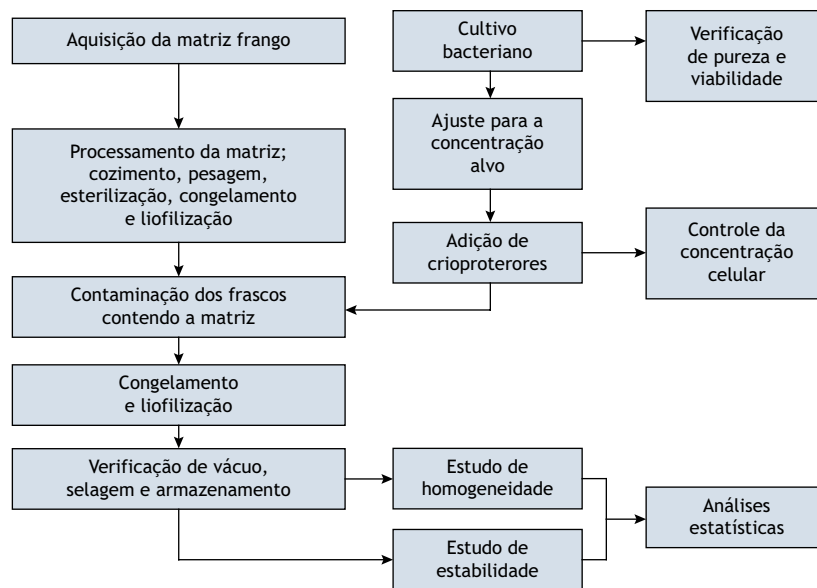
MÉTODO

Desenvolvimento da metodologia de produção de itens de ensaio

Foram produzidos três lotes-piloto denominados EC-P, SALM-P e BCSTA-P contendo *E. coli*; *Salmonella* Enteritidis; *B. cereus* + *S. aureus*, respectivamente, com 50 frascos cada. A produção destes lotes-piloto visou avaliar a viabilidade dos microrganismos nessa matriz antes da produção de lotes em maior escala. Posteriormente, foram produzidos outros três lotes finais denominados EC-F, SALM-F e BCSTA-F, contendo 150 frascos cada. Os mesmos procedimentos foram usados para todos os lotes. O desenvolvimento da metodologia para a produção dos IE teve como base a metodologia descrita por Brandão et al.¹², que utilizaram a técnica de liofilização para produção de IE contendo bactérias em matriz carne bovina. Um esquema contendo as etapas deste estudo pode ser visualizado na Figura 1.

Preparo da matriz

O frango foi obtido em um supermercado do município do Rio de Janeiro-RJ na forma de filés de frango congelados de uma mesma marca e estes se apresentavam dentro do prazo de validade. Os filés de frango foram imersos em água e cozidos sob pressão por 20 min. Ao final do cozimento, a água foi descartada e o frango desfiado foi fracionado em alíquotas de 5,0 g em frascos de vidro com capacidade de 25 mL (Schott, Brasil) com rolhas de borracha próprias para liofilização (Schott, Brasil). A fim de eliminar a contaminação intrínseca, os frascos contendo a matriz foram submetidos a um ciclo de esterilização de 121°C/15 min.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Figura 1. Esquema das etapas de produção dos lotes de itens de ensaio contendo microrganismos em matriz frango.

Em seguida, foram congelados em *ultrafreezer* a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ (THERMO, EUA) e submetidos a um ciclo de liofilização por 24 h a 200 μbar em liofilizador modelo Minifast 4 (IMALIFE, China).

Cultivo das cepas bacterianas

A escolha dos microrganismos seguiu os critérios da legislação brasileira vigente na época, a RDC nº 12/2001¹¹, indicada para pratos prontos para o consumo à base de carne de frango. As cepas de *E. coli* (P4328), *Salmonella* Enteritidis (P3440), *B. cereus* (P3441) e *S. aureus* (P4283) foram isoladas de: alface *in natura*, coxa de frango congelada, farinha de mandioca e queijo tipo ricota, respectivamente. Estas bactérias foram isoladas no Setor de Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) e tiveram sua identidade confirmada por caracterização fenotípica com uso do sistema semiautomatizado Vitek 2.0 (bioMérieux, Durham NC, EUA) e provas bioquímicas convencionais¹³.

Todas as cepas foram cultivadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis foram, em seguida, cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) com 2,4% de NaCl (Difco, EUA) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 28 h. Oito mililitros de cada cultura foram centrifugados a 9.000 g por 10 min (Eppendorf, EUA) em microtubos estéreis com capacidade de 2 mL cada. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado, ressuspenso em solução salina peptonada (SSP) a 0,1%. Em seguida, foram homogeneizados em aparelho agitador de tubos. Para as culturas de *Salmonella* Enteritidis e *E. coli*, foram descartados os sobrenadantes e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de SSP a 0,1% (Merck, Alemanha) com 100 mM de crioprotetor trealose. Já para as culturas de *B. cereus* e *S. aureus*, foi utilizado o crioprotetor sacarose (100 mM). A concentração foi ajustada em fotocolorímetro (Libra S2, biochrom, Inglaterra) em comprimento de

onda de 520 nm. Diluições foram realizadas em SSP a 0,1% para atingir a concentração-alvo em cada lote. Para as culturas de *Salmonella* Enteritidis e *E. coli*, a suspensão bacteriana foi mantida durante aproximadamente 30 min a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Na preparação do lote final de *E. coli* (EC-F), optou-se por preparar o lote com uma concentração superior ao lote-piloto (EC-P) para que os laboratórios participantes pudessem utilizar a metodologia de contagem em placas, que é recomendada para alimentos que se espera uma carga microbiana superior a $10^2/\text{g}$ ¹³.

Preparo dos itens de ensaio

Foi realizada uma diluição 1:100 da suspensão contendo as bactérias em SSP a 0,1% contendo crioprotetor. Esta solução foi homogeneizada em uma placa agitadora (Corning, EUA), com uso de um magneto estéril, durante 30 min e mantida em banho de gelo, sendo que este último possuía a função de manter a temperatura da solução em torno de 4°C , de forma que as bactérias não proliferassem, não alterando a concentração-alvo desejada antes da liofilização. Ainda em agitação, volumes de 0,5 mL da suspensão foram dispensados nos frascos contendo 5 g de frango pré-liofilizado com uso de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, Inglaterra).

A fim de verificar o número de células a ser utilizado no inóculo das alíquotas de frango, foram realizadas diluições seriadas das suspensões de microrganismos e plaqueados em ágar padrão para contagem (APC) (Merck, Alemanha) de *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Já para os demais microrganismos, foram preparadas diluições decimais em SSP a 0,1% e 0,1 mL, foi semeado, pela técnica *spread-plate*, em duplicata, em ágar Baird Parker (DIFCO, França) e ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP, DIFCO, França) para contagem de *S. aureus* e *B. cereus*, respectivamente. As placas de ágar



Baird Parker foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h, enquanto as placas de ágar MYP foram incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Essa quantificação foi realizada após a homogeneização da solução, antes da contaminação dos frascos, com o objetivo de verificar se a concentração de células presente na solução estava similar a planejada.

Os frascos foram congelados em *ultrafreezer* a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e submetidos novamente a um ciclo de liofilização por 26 h, conforme descrito anteriormente. Após a retirada dos frascos fechados do liofilizador, foi realizada uma inspeção visual com o objetivo de avaliar o aspecto das amostras liofilizadas. Frascos que apresentassem o material com aspecto liquefeito ou caramelizado seriam descartados. Os frascos aprovados nesta inspeção foram testados quanto à presença de vácuo utilizando um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, 2-12-8, Brasil). Os frascos que apresentaram presença de vácuo foram lacrados com tampas de metal, etiquetados e estocados a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e $-20 \pm 4^\circ\text{C}$, os que não apresentaram presença de vácuo foram descartados.

Estudo de homogeneidade

Foi realizada a quantificação de dez unidades de cada lote-piloto e 16 unidades de cada lote final, selecionados aleatoriamente, usando como ferramenta para essa seleção a amostragem do programa Microsoft Office Excel® 2010. As análises foram realizadas um dia após a liofilização e armazenagem dos lotes. Os frascos foram retirados do freezer a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e mantidos à temperatura ambiente durante 30 min antes da análise. A matriz foi reconstituída com 20 mL de SSP a 0,1%. Após 15 min, a matriz foi transferida para um saco plástico estéril *Whirl-Pak® Filter Bag* (Nasco, EUA) e foram adicionados mais 25 mL de SSP a 0,1%. Em seguida, foi homogeneizada em aparelho *Stomacher (Seward Fisher Scientific, Canadá)*, em nível de velocidade normal durante 1 min, perfazendo a diluição 10^{-1} . A partir da diluição 10^{-1} , foram preparadas diluições decimais seriadas.

Para os estudos da homogeneidade para contagem de *E. coli*, foi empregada a metodologia de semeadura em profundidade em 10 mL de ágar APC. Após 4 h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, adicionou-se 10 mL de uma sobrecamada de ágar vermelho violeta bile lactose (VRBA, Difco, França)¹². Além disso, foi realizada a técnica do número mais provável (NMP) em caldo laurel triptose (LST)¹⁴. Para contagem de *Salmonella* Enteritidis, foi realizada semeadura em profundidade em 10 mL de APC. Após 4 h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, adicionou-se 10 mL de ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose (VRBG, Difco, França)¹². Já para a contagem de *S. aureus* e *B. cereus*, esta foi realizada pela técnica de *spread-plate* em ágar Baird Parker¹⁵ e ágar MYP¹⁶, respectivamente. Foi realizada a contagem das colônias nas placas levando em conta o limite de precisão das técnicas supracitado.

A avaliação estatística da homogeneidade foi realizada de acordo com o protocolo harmonizado¹⁷, atribuindo-se o valor do desvio-padrão alvo (σ) para a concentração celular de $0,25 \log_{10}$, que é um valor já estabelecido e comumente utilizado por provedores em outras rodadas de EP, incluindo o INCQS/Fiocruz^{12,18,19,20,21,22,23}. A partir dos resultados obtidos, foi

comparado o valor da variância entre as amostras (S^2_{am}) com o valor crítico da homogeneidade (c). Se $S^2_{am} < c$, o lote é considerado suficientemente homogêneo.

Estudo de estabilidade em longo e curto prazo

Foram realizados estudos de estabilidade em longo prazo nas temperaturas de armazenamento $-20 \pm 4^\circ\text{C}$, e de referência $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ nos lotes-piloto e finais; e de estabilidade em curto prazo nos lotes finais. Este último estudo mimetiza as temperaturas a que os IE poderão ser expostos durante o envio aos laboratórios participantes do EP.

A estabilidade em longo prazo foi analisada seguindo o modelo clássico²⁴. O período avaliado neste estudo está apresentado no Quadro, que demonstra, em cada ponto analisado, dois frascos do lote, utilizando a metodologia descrita no estudo de homogeneidade.

Para a condução do estudo de estabilidade em curto prazo, foi utilizada a metodologia do *Isochronous Design* ou modelo isócrono²⁴. Foram avaliadas as condições de estabilidade em um período de quatro dias, em duas temperaturas: $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A cada dia, quatro frascos, que estavam estocados a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$, foram selecionados aleatoriamente e acondicionados em duas caixas próprias para transporte de material biológico (dois frascos em cada caixa). As caixas foram incubadas nas temperaturas testadas até um total de quatro dias. As condições de incubação de tempo e temperatura foram mantidas até a data de análise. Quatro dias após a data da primeira incubação, os frascos foram analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições, maximizando assim a repetitividade das análises. As metodologias utilizadas para enumeração das bactérias foram as mesmas descritas no estudo da homogeneidade.

Quadro. Esquema do estudo de estabilidade em longo prazo dos lotes produzidos neste estudo.

| Lote | Temperatura ($^\circ\text{C}$) | Nº de análises realizadas (período em que a análise foi realizada em dias) |
|---------|----------------------------------|--|
| SALM-P | -80 ± 10 | 3 (0, 7, 21) |
| | -20 ± 4 | 4 (0, 7, 21 e 35) |
| SALM-F | -80 ± 10 | 7 (0, 3, 31, 62, 90, 115 e 153) |
| | -20 ± 4 | 7 (0, 3, 17, 31, 45, 62 e 80) |
| EC-P | -80 ± 10 | 3 (0, 8, 22) |
| | -20 ± 4 | 4 (0, 8, 22) |
| EC-F | -80 ± 10 | 6 (0, 15, 35, 63, 93 e 126) |
| | -20 ± 4 | 7 (0, 11, 21, 35, 49, 63 e 84) |
| BCSTA-P | -80 ± 10 | 3 (0, 7, 22) |
| | -20 ± 4 | 4 (0, 8, 22 e 38) |
| BCSTA-F | -80 ± 10 | 3 (0, 7 e 35) |
| | -20 ± 4 | 5 (0, 7, 21, 38 e 49) |

Fonte: Elaborado pelos autores, 2020.

SALM: lotes produzidos com *Salmonella* Enteritidis; EC: lotes produzidos com *E. coli*; BCSTA: lotes produzidos com *B. cereus* e *S. aureus*; P: lotes produzidos em escala piloto; F: lotes finais produzidos em maior escala.



A avaliação estatística dos resultados foi realizada pela análise de resíduos da regressão em conjunto com a Análise de Variância (Anova) de acordo com a ABNT ISO Guia 35²⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle da concentração celular durante o preparo dos itens de ensaio

A concentração das bactérias não apresentou diferenças logarítmicas significativas após o processo de liofilização, exceto para o lote EC-F (Tabela 1). Apesar do aumento da concentração celular do lote EC-F no momento da produção, houve decréscimo proeminente após o processo de liofilização, o que não foi observado durante a produção do lote-piloto EC-P, mesmo sendo utilizado o mesmo processo de produção. Logo, a concentração do crioprotetor (trealose a 100 mM) pode não ter sido suficiente para evitar a morte celular durante a liofilização nesta concentração mais elevada de *E. coli*. Outros estudos são necessários para a

compreensão da instabilidade desse microrganismo na produção de IE nesta matriz. Nos demais lotes, os resultados indicaram que a liofilização não alterou a concentração das bactérias de forma significativa.

Nenhum frasco foi reprovado após a inspeção visual. Em relação à presença de vácuo, observou-se uma variação de 87,8% a 96,0% nos lotes produzidos (Tabela 1). Este resultado foi similar aos obtidos em outros estudos que utilizaram a liofilização no preparo de lotes de IE para EP e detectaram, no mínimo, 83,3% dos frascos com presença de vácuo nos lotes produzidos^{12,18,19,21,22,23,25}.

Estudo de homogeneidade

Os resultados do estudo de homogeneidade estão apresentados na Tabela 2. A homogeneidade garante que os laboratórios participantes de um EP recebam IE que não apresentem diferenças significativas nos parâmetros a serem mensurados^{17,24}. Neste estudo, todos os lotes se apresentaram suficientemente homogêneos, segundo

Tabela 1. Concentração dos microrganismos nos lotes antes e após o processo de liofilização e percentual de vácuo.

| Lotes | Concentração celular (log ₁₀ UFC/g) | | | Presença de vácuo (%) |
|----------------------------|--|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | Concentração final esperada | Antes da liofilização | Após a liofilização | |
| SALM-P | 3,70 | 3,64 | 3,00 | 87,8 |
| SALM-F | 3,70 | 3,56 | 3,18 | 94,6 |
| EC-P | 2,00 | 2,04 | 2,26 | 91,6 |
| EC-F | 3,70 | 4,34 | 2,84 | 92,0 |
| BCSTA-P - <i>B. cereus</i> | 4,00 | 4,72 | 4,11 | 90,0 |
| <i>S. aureus</i> | 3,70 | 4,08 | 3,60 | |
| BCSTA-F - <i>B. cereus</i> | 4,00 | 4,04 | 3,92 | 95,9 |
| <i>S. aureus</i> | 3,70 | 4,28 | 3,67 | |

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

UFC: unidades formadoras de colônia; SALM: lotes produzidos com *Salmonella* Enteritidis; EC: lotes produzidos com *E. coli*; BCSTA: lotes produzidos com *B. cereus* e *S. aureus*; P: lotes produzidos em escala-piloto; F: lotes finais produzidos em maior escala.

Tabela 2. Resultado do estudo de homogeneidade dos lotes-piloto e final contendo *Salmonella* Enteritidis, *E. coli*, e *B. cereus* + *S. aureus* produzidos neste estudo.

| Lote | Microrganismo | Método | Média (log ₁₀ /g) | S ² am | c | Resultado |
|---------|-------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|------|-----------|
| SALM-P | <i>Salmonella</i> Enteritidis | Contagem em placa | 3,05 | 0,009 | 0,01 | SH |
| SALM-F | <i>Salmonella</i> Enteritidis | Contagem em placa | 1,98 | 0,010 | 0,02 | SH |
| EC-P | <i>E. coli</i> | Contagem em placa | 1,54 | 0,010 | 0,03 | SH |
| | | NMP | 1,46 | 0,010 | 0,04 | SH |
| EC-F | <i>E. coli</i> | Contagem em placa | 2,92 | 0,001 | 0,01 | SH |
| | | NMP | 2,84 | 0,010 | 0,06 | SH |
| BCSTA-P | <i>B. cereus</i> | Contagem em placa | 3,99 | 0,001 | 0,06 | SH |
| | <i>S. aureus</i> | Contagem em placa | 3,70 | 0,010 | 0,36 | SH |
| BCSTA-F | <i>B. cereus</i> | Contagem em placa | 3,98 | 0,010 | 0,02 | SH |
| | <i>S. aureus</i> | Contagem em placa | 3,71 | 0,001 | 0,02 | SH |

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

SALM: lotes produzidos com *Salmonella* Enteritidis; EC: lotes produzidos com *E. coli*; BCSTA: lotes produzidos com *B. cereus* e *S. aureus*; P: lotes produzidos em escala-piloto; F: lotes finais produzidos em maior escala; SH: suficientemente homogêneo; NMP: Número mais provável; S²am: valor da variância entre as amostras; c: valor crítico da homogeneidade.



o Protocolo Harmonizado (Tabela 2). Esse resultado é coerente com estudos anteriores que utilizaram a bomba peristáltica para distribuição da suspensão bacteriana sob agitação constante e a técnica de liofilização para o preparo de IE com microrganismos em matrizes como queijo e leite^{19,20,25}. Brandão et al.¹² obtiveram êxito em produzir IE suficientemente homogêneos contendo *Salmonella* Enteritidis em matriz carne bovina crua.

Estudos de estabilidade

Os resultados do estudo de homogeneidade estão apresentados na Tabela 3.

O estudo de estabilidade verifica as possíveis variações que os IE de um lote possam sofrer, alterando a sua característica de homogeneidade²⁴. Inicialmente, foi realizada uma análise de tendência pela visualização dos dados em forma de gráficos (Figura 2). Nesta análise, foi constatado que o lote BCSTA-F

apresentou queda vertiginosa do número de UFC/g de *B. cereus* após 49 dias estocado a $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ e, conseqüentemente, foi considerado insuficientemente estável (Figura 2B). Posteriormente, foi realizada a análise de regressão linear que demonstrou que os IE foram considerados suficientemente estáveis nos demais lotes avaliados.

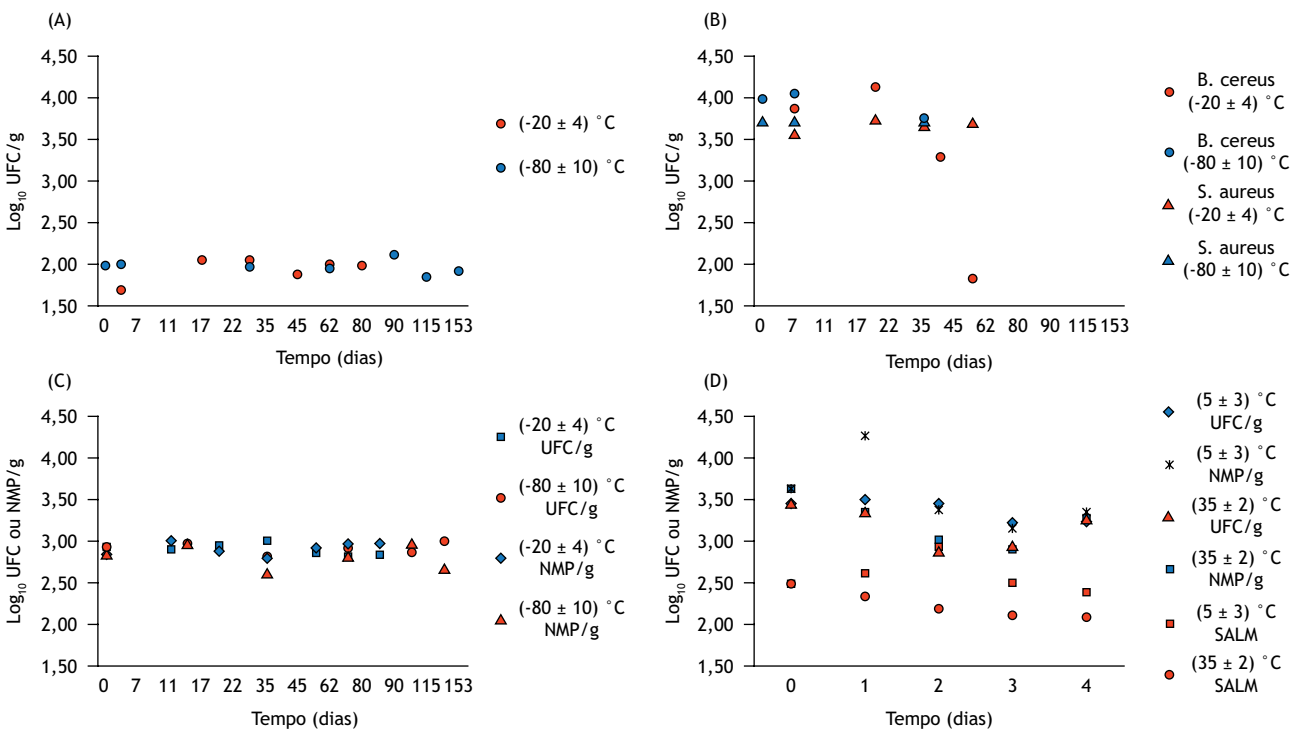
Apesar de a concentração de UFC/g de *S. aureus* ter se mantida estável no lote BCSTA-F, o declínio acentuado da concentração de *B. cereus* acarretou a não utilização desse lote em um EP. Em contraste com o lote final, o lote-piloto BCSTA-P apresentou estabilidade nas duas temperaturas estudadas. Isso pode ter ocorrido, pois o período de análise de estabilidade do lote-piloto foi inferior (apenas 38 dias) quando comparado ao lote oficial (49 dias). A grande vantagem do estudo de estabilidade em longo prazo realizado no modelo clássico é conhecer a concentração do microrganismo no lote em cada análise realizada nos intervalos de termos determinados. Desta forma, foi possível observar o

Tabela 3. Resultados do estudo de estabilidade dos lotes produzidos neste estudo.

| Lote | Método | Temperatura de estudo ($^\circ\text{C}$) | Coefficiente angular | Limite inferior (95%) | Limite superior (95%) | Resultado |
|------------------------------|--------------------|--|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| SALM-P | Contagem em placas | -80 ± 10 | -0,00320 | -0,05700 | 0,05000 | SE |
| | | -20 ± 4 | -0,00355 | -0,01399 | 0,00690 | SE |
| SALM-F | Contagem em placas | -80 ± 10 | -0,00056 | -0,00300 | 0,00180 | SE |
| | | -20 ± 4 | 0,00110 | -0,00353 | 0,00574 | SE |
| | | 5 ± 3 | -0,03170 | -0,26820 | 0,20490 | SE |
| | | 35 ± 2 | -0,10360 | -0,15860 | -0,04860 | NE |
| EC-P | Contagem em placas | -80 ± 10 | -0,00540 | -0,12000 | 0,11000 | SE |
| | | -20 ± 4 | -0,01744 | -0,03662 | 0,00174 | SE |
| | NMP | -80 ± 10 | -0,00057 | -0,07200 | 0,07100 | SE |
| | | -20 ± 4 | -0,01405 | -0,03883 | 0,01073 | SE |
| EC-F | Contagem em placas | -80 ± 10 | 0,00036 | -0,00140 | 0,00220 | SE |
| | | -20 ± 4 | -0,00140 | -0,00325 | 0,00046 | SE |
| | | 5 ± 3 | -0,06930 | -0,13930 | 0,00080 | SE |
| | | 35 ± 2 | -0,07630 | -0,34040 | 0,18780 | SE |
| | NMP | -80 ± 10 | 0,00200 | -0,00270 | 0,00670 | SE |
| | | -20 ± 4 | 0,00039 | -0,00223 | 0,00300 | SE |
| BCSTA-P (<i>B. cereus</i>) | Contagem em placas | 5 ± 3 | -0,16400 | -0,55270 | 0,22470 | SE |
| | | 35 ± 2 | -0,11480 | -0,36190 | 0,13240 | SE |
| | | -80 ± 10 | -0,00320 | -0,07100 | 0,06400 | SE |
| | | -20 ± 4 | 0,00154 | -0,00579 | 0,00887 | SE |
| BCSTA-P (ECP) | Contagem em placas | -80 ± 10 | 0,00710 | -0,00170 | -0,12000 | SE |
| | | -20 ± 4 | 0,00707 | -0,00169 | 0,01583 | SE |
| BCSTA-F (<i>B. cereus</i>) | Contagem em placas | -80 ± 10 | -0,01000 | -0,05200 | 0,03200 | SE |
| | | -20 ± 4 | -0,05864 | -0,13024 | 0,01296 | SE |
| BCSTA-F (ECP) | Contagem em placas | -80 ± 10 | -0,00160 | -0,00650 | 0,00330 | SE |
| | | -20 ± 4 | 0,00166 | -0,00485 | 0,00817 | SE |

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

SALM: lotes produzidos com *Salmonella* Enteritidis; EC: lotes produzidos com *E. coli*; BCSTA: lotes produzidos com *B. cereus* e *S. aureus*; P: lotes produzidos em escala piloto; F: lotes finais produzidos em maior escala; NMP: número mais provável; SE: suficientemente estável; NE: não suficientemente estável; ECP: estafilococos coagulase positiva.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Figura 2. Estudo de estabilidades dos lotes finais produzidos. (A) Estabilidade em longo prazo do lote SALM-F; (B) Estabilidade em longo prazo do lote BCSTA-F; (C) Estabilidade em longo prazo do lote EC-F pelas técnicas de contagem em placas e número mais provável; (D) Estabilidade em curto prazo dos lotes SALM-F e do lote EC-F pelas técnicas de contagem em placas e número mais provável.

comportamento de instabilidade dos microrganismos na matriz, antes do envio para os laboratórios participantes do EP. A opção da produção deste lote misto contendo os dois microrganismos teve como objetivo economizar custos na produção e para o usuário do IE, pois ele utilizaria o mesmo item para as duas análises. O decréscimo do número de células de *B. cereus* no lote BCSTA-F pode ter ocorrido devido à competitividade dos dois microrganismos por nutrientes ao longo do tempo²⁶, com prevalência de *S. aureus*, em detrimento de *B. cereus*. O ágar MYP, utilizado para contagem de *B. cereus*, não possui inibidor para *S. aureus*¹⁵, logo, esta espécie pode crescer nesse meio de cultura, apesar de suas colônias se diferenciarem claramente de *B. cereus* pela fermentação do manitol e, conseqüentemente, pela coloração amarela. O meio Baird Parker, em contrapartida, possui alta concentração de sais, inibindo o crescimento de *B. cereus*. Possivelmente, por esse motivo, não foi observada alteração na contagem de *S. aureus* nos lotes produzidos. Devem-se aprofundar os conhecimentos acerca da interação entre as duas espécies, *S. aureus* e *B. cereus*, na matriz frango, além da relação e influência da matriz sobre esses microrganismos por tempo determinado. Dessa maneira, futuramente, poderão ser produzidos lotes mistos com homogeneidade e estabilidade suficientes para serem utilizados em EP, reduzindo os custos na produção e, conseqüentemente, no preço destes IE ofertados aos participantes do EP.

Na temperatura de referência $-80 \pm 10^\circ\text{C}$, todos os lotes se apresentaram estáveis pelo período estudado. No lote final SALM-F, os IE mantiveram-se estáveis por 153 dias a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e 80 dias

a $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ (Figura 2A). Com relação aos lotes contendo *E. coli*, o lote final EC-F se manteve estável por 126 dias a $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ e 84 dias a $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ (Figura 2C). A estabilidade dos IE à temperatura de $-80 \pm 10^\circ\text{C}$ por período expressivo demonstra que estes podem ser estocados tanto pelo laboratório produtor, quanto pelos laboratórios participantes do EP, por espaço de tempo longo com a segurança de que a viabilidade não será perdida. Outros estudos relataram estabilidade de IE contendo *E. coli*^{19,20,25} e *Salmonella* Enteritidis^{22,23} em diferentes matrizes, como queijo, leite e chocolate, produzidos com a técnica de liofilização por tempo semelhante ou maior que o avaliado no presente estudo. A produção de IE estáveis a temperaturas de $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ em período prolongado também é importante devido ao fato de nem todos os laboratórios possuírem equipamentos para estocar os IE a temperaturas $\leq -70^\circ\text{C}$. Logo, esses laboratórios podem adquirir os IE e estocá-los em equipamentos usuais, como *freezers* comuns, e usá-los em um prazo maior¹⁹. Esses resultados indicam que a técnica de liofilização e utilização de crioprotetores na produção dos lotes na matriz frango foi satisfatória para preservação das bactérias ao longo do estoque em longo prazo.

No estudo de estabilidade em curto prazo, o lote EC-F apresentou-se suficientemente estável nas duas temperaturas avaliadas tanto na avaliação do gráfico de tendência (Figura 2D), quanto pela análise de regressão linear. Entretanto, o lote de SALM-F apresentou-se suficientemente estável apenas na temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (Figura 2D). Estudos anteriores já relataram a insuficiência de estabilidade em lotes de IE contendo



bactérias Gram-negativas em diferentes matrizes quando estocados em temperaturas iguais ou similares a 35°C^{12,18,19}. Logo, um controle da temperatura durante o transporte de IE contendo *Salmonella* Enteritidis nesta matriz é mandatório para que os laboratórios não corram o risco de receber IE comprometidos devido a excursões de temperaturas. Como o transporte de materiais biológicos em temperatura de refrigeração é dispendioso, a obtenção de IE estáveis a temperaturas elevadas é importante para baratear o custo do envio, consequentemente, diminuindo o custo total da participação do laboratório no EP²⁵. Desta forma, mais estudos serão necessários para obtenção de

lotes contendo *Salmonella* spp. em matriz frango estáveis a temperaturas de transporte mais elevadas.

CONCLUSÕES

A matriz frango cozido desfiado associada à técnica de produção por liofilização foi considerada satisfatória para produção de IE contendo somente *E. coli* ou *Salmonella* Enteritidis, levando em consideração que se apresentaram suficientemente homogêneos e estáveis por todo o período de estudo, um mínimo de 80 dias a -20 ± 4°C e 126 dias a -80 ± 10°C.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA. Relatório anual 2017. São Paulo: Associação Brasileira de Proteína Animal; 2018.
2. Penha Filho RAC, Ferreira JC, Kanashiro AMI, Berchieri Junior A, Darinib ALC. Emergent multidrug resistant non-typhoidal *Salmonella* serovars isolated from poultry in Brazil co-harboring blactx-m-2 and qnrB or blacmy-2 in large plasmids. *Diagn Microb Infec Dis*. 2019;95(1):93-8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.003>
3. Li Y, Pei X, Zhang X, Wu L, Liu Y, Zhou H et al. A surveillance of microbiological contamination on raw poultry meat at retail markets in China. *Food Control*. 2019;104:99-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.037>
4. World Health Organization - WHO. Global strategy and action plan on ageing and health 2016-2020. Geneva: World Health Organization; 2015.
5. Ministério da Saúde (BR). Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2019[acesso 3 out 2020]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>
6. Rosas CO, Rodrigues JM, Cruz MHC, Lopes SMR, Souto ASS, Brandão MLL et al. Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. *Braz J Food Technol*. 2019;22:1-11. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20817>
7. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Brasília: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2017.
8. Eurachem. Eurachem guide: selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories. 2a ed. London: Eurachem; 2011.
9. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro. Orientação para acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaio de proficiência. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2012.
10. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro. Acordos de reconhecimento mútuo. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2019.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial União. 10 jan 2001.
12. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Vieira LR, Medeiros VM et al. Avaliação de matrizes de carne bovina na produção de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. *Alim Nutr*. 2014;25(1):13-8.
13. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5a ed. São Paulo: Blucher; 2017.
14. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: US Food and Drug Administration - FDA. Bacteriological analytical manual (BAM). 8a ed. Silver Spring: US Food and Drug Administration; 2017[acesso 6 jul 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
15. Tallent S, Hait J, Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. In: US Food and Drug Administration - FDA. Bacteriological analytical manual (BAM). 8a ed. Silver Spring: US Food and Drug Administration; 2017[acesso 6 jul 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>
16. Tallent SM, Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW. *Bacillus cereus*. In: US Food and Drug Administration - FDA. Bacteriological analytical manual (BAM). 8a ed. United States:Spring; 2017[acesso 6 jul 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>
17. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem*. 2006;78(1):145-96. <https://doi.org/10.1351/pac200678010145>



18. Rosas CO, Brandão MLL, Bricio SML, Medeiros VMM, Bernardo SPC, Cruz MHC et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):15-22.
19. Brandão MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS et al. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Braz J Food Technol*. 2013;16(1):73-9. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232013005000006>
20. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. *Analytica*. 2013;11(63):70-1.
21. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Cruz MHC et al. Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leite. *Vigil Sanit Debate*. 2014;2(1):39-45. <https://doi.org/10.3395/vd.v2i1.60>
22. Costa JCB, Rosas CO, Bricio SML, Brandão MLL, Medeiros VM, Pinheiro RR et al. Preparo de itens de ensaio de proficiência em matriz queijo para a pesquisa de *Salmonella* spp. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):11-8. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00367>
23. Silva MLC, Brandão MLL, Rosas CO, Medeiros VM, Silva CC, Tavares RDO et al. Desenvolvimento de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz chocolate. *Vigil Sanit Debate*. 2017;5(2):106-12. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00838>
24. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT NBR ISO GUIA 35. Materiais de referência: princípios gerais e estatísticos para certificação. Brasília: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2012.
25. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(2):124-30.
26. Ghoul M, Mitri S. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol*. 2016;24(10):833-45 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>

Agradecimentos

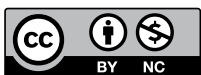
Ao programa de Residência Multiprofissional em Vigilância Sanitária com ênfase em Qualidade do INCQS pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional à aluna Ingrid Camelo da Silva e ao Ministério da Saúde.

Contribuição dos Autores

Silva IC, Medeiros VM, Rosas CO, Lopes SMR, Brandão MLL - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Costa PV, Vasconcellos L, Coimbra PT - Aquisição, interpretação dos dados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY-NC atribuição não comercial. Com essa licença é permitido acessar, baixar (download), copiar, imprimir, compartilhar, reutilizar e distribuir os artigos, desde que para uso não comercial e com a citação da fonte, conferindo os devidos créditos de autoria e menção à *Visa em Debate*. Nesses casos, nenhuma permissão é necessária por parte dos autores ou dos editores.